

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-269442

(43)Date of publication of application : 30.09.2004

(51)Int.Cl.

A61K 47/16

A61K 9/127

(21)Application number : 2003-063803

(71)Applicant : OXYGENIX:KK

(22)Date of filing : 10.03.2003

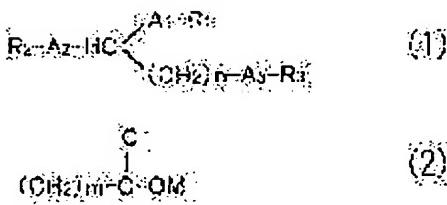
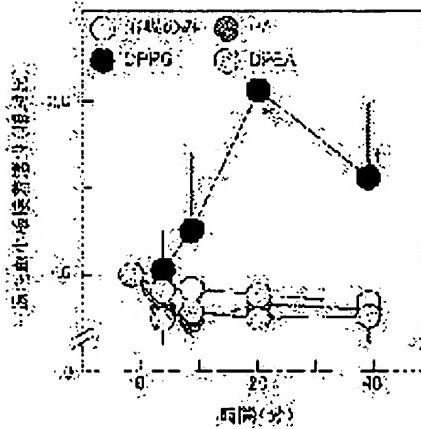
(72)Inventor : SUEMATSU MAKOTO
SUGANUMA KAZUHIRO

(54) LIPOSOME STABILIZER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a liposome stabilizer hardly causing microcirculation-damaging action such as a platelet-activating action and a leukocyte-adhesive action; to provide a liposome containing the liposome stabilizer; and to provide a kit including the liposome stabilizer.

SOLUTION: The liposome stabilizer contains a carboxylic acid-type lipid represented by general formula 1 [one of R₁, R₂ and R₃ is represented by general formula 2 (M is a hydrogen atom or a monovalent cation; and m is an integer of 1–5 representing the length of a methylene chain), and the other two are each a linear hydrocarbon group; A₁, A₂ and A₃ are each independently one selected from C(O)O, CONH or NHCO; and n is an integer of 1–3 representing the length of a methylene chain]. The liposome contains the liposome stabilizer. The kit includes the liposome stabilizer.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.12.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-269442
(P2004-269442A)

(43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl.⁷A 61 K 47/16
A 61 K 9/127

F I

A 61 K 47/16
A 61 K 9/127

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6

		審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁)
(21) 出願番号	特願2003-63803 (P2003-63803)	(71) 出願人 503185437
(22) 出願日	平成15年3月10日 (2003. 3. 10)	株式会社 オキシジェニクス 東京都港区虎ノ門四丁目1番1号
		(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
		(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二
		(74) 代理人 100093676 弁理士 小林 純子
		(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
		(72) 発明者 末松 誠 東京都新宿区信濃町35番 慶應義塾大学 医学部内

最終頁に続く

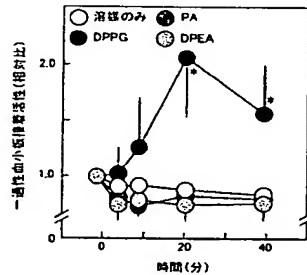
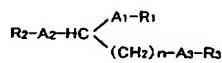
(54) 【発明の名称】リポソーム安定化剤

(57) 【要約】

【課題】血小板活性化作用や白血球接着活性化作用などの微小循環障害作用の生じないリポソーム安定化剤、そのリポソーム安定化剤を含有したリポソーム、及びそのリポソーム安定化剤を含んだキットを提供する。

【解決手段】次の一般式

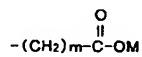
【化1】



(式中、

R 1, R 2, 及び R 3 のうち、いずれか一つが次の一般式

【化2】



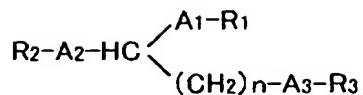
[式中、Mは水素原子または一価の陽イオンであり、

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の一般式

【化 1】

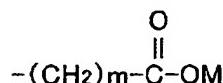


(式中、

10

R₁，R₂，及びR₃のうち、いずれか一つが次の一般式

【化 2】



[式中、Mは水素原子または一価の陽イオンであり、
mはメチレン鎖長を示す1～5の整数である。]

20

であり、他の二つが、鎖状炭化水素基であり、

A₁，A₂，及びA₃は、独立にC(=O)O，CONH，またはNHC(=O)から選択され、
nはメチレン鎖長を示す1～3の整数である。)

で表されるカルボン酸型脂質を含むリポソーム安定化剤。

【請求項 2】

リポソームに含有させた時、前記リポソームが生体内で血小板活性化作用を有しないことを特徴とする請求項1に記載のリポソーム安定化剤。

【請求項 3】

リポソームに含有させた時、前記リポソームの生体内への投与が循環血液中の血小板数を減少させないことを特徴とする請求項1または2に記載のリポソーム安定化剤。

【請求項 4】

リポソームに含有させた時、前記リポソームが生体内で血小板の一過性接着反応を引き起こさないことを特徴とする請求項1または2に記載のリポソーム安定化剤。

30

【請求項 5】

リポソームに含有させた時、前記リポソームが生体内で白血球接着活性化作用を有しないことを特徴とする請求項1に記載のリポソーム安定化剤。

【請求項 6】

前記カルボン酸型脂質がDPEA(ジバルミトイールグルタミン酸Nコハク酸；1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-Nsuccinic acid)であることを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載のリポソーム安定化剤。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれかに記載の前記リポソーム安定化剤を含有したリポソーム。

40

【請求項 8】

疾患治療用化合物を含む請求項7に記載のリポソーム。

【請求項 9】

請求項1～6のいずれかに記載の前記リポソーム安定化剤を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カルボン酸型脂質を含むリポソーム安定化剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

50

リポソームは、細胞膜などの生体膜に模して人工的に作られた小胞である。リポソームは、遺伝子治療の際の遺伝子導入用キャリア、赤血球を内包した酸素運搬体、水溶性・脂溶性の薬物を含むドラッグ・キャリアなどに用いられる。

【0003】

構造上は、典型的には脂質二重膜の形をとる。例えば、コレステロールなどの膜構成脂質と、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) やジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) などのリン脂質との混合懸濁液を激しく搅拌することによって、脂質二重膜でできた小胞ができる。この場合、リン脂質は膜安定化剤としての役目を持ち、リン脂質を加えないと、三重膜になつたりして、膜の形状が安定しなくなる。

【0004】

10

【発明が解決しようとする課題】

しかし、リン脂質は、生体内で血小板活性化作用や白血球接着活性化作用を有しており、そのため、リン脂質を含んだリポソームを投与すると、血栓ができたり、血小板減少症や白血球の機能障害が起きたりするという副作用が生じる。このことは、特に、リポソーム製剤を出血性ショックの病態で酸素運搬体として用いたり、癌患者で血小板数が低い症例に遺伝子導入のための核酸や制癌剤等の薬物の運搬体として用いたりする上で、大きな障壁となる。

【0005】

20

そこで、本発明は、血小板活性化作用や白血球接着活性化作用などの微小循環障害作用の生じないリポソーム安定化剤、そのリポソーム安定化剤を含有したリポソーム、及びそのリポソーム安定化剤を含んだキットを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

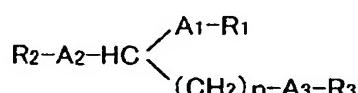
最近、両親和性の脂質として、リン酸基をもたないカルボン酸型脂質が開発された。本発明者らは、この脂質がリン酸基を持たないことに着目し、初めてリポソーム安定化剤として使用し、生体内で血小板活性化作用や白血球接着活性化作用などの微小循環障害作用を生じないことを見いだし、本発明を完成させた。

【0007】

本発明のリポソーム安定化剤は、次の一般式

【化3】

30

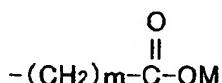


(式中、

R 1, R 2, 及び R 3 のうち、いずれか一つが次の一般式

【化4】

40



[式中、M は水素原子または一価の陽イオンであり、

m はメチレン鎖長を示す 1 ~ 5 の整数である。]

であり、他の二つが、鎖状炭化水素基であり、

A 1, A 2, 及び A 3 は、独立に C (O) O, CONH, または NHCO から選択され、n はメチレン鎖長を示す 1 ~ 3 の整数である。)

で表されるカルボン酸型脂質を含む。

【0008】

また、リポソームに含有させた時、リポソームが生体内で血小板活性化作用を有しないこ

50

とを特徴としてもよい。ここで、血小板活性化作用とは、血小板を活性化することであり、例えば、血小板膜糖タンパク質 I b (GPIb) を通じてシグナル伝達系を活性化するなど、血小板を活性化した時に何らかの反応を特異的に生じさせる作用であればよい。

【0009】

また、リポソームに含有させた時、リポソームの生体内への投与が循環血液中の血小板数を減少させないことを特徴としてもよい。

【0010】

また、リポソームに含有させた時、リポソームが生体内で血小板の一過性接着反応を引き起こさないことを特徴としてもよい。

10

【0011】

また、リポソームに含有させた時、リポソームが生体内で白血球接着活性化作用を有しないことを特徴としてもよい。

【0012】

ここで、上記リポソームが、血小板活性化作用を有しない、循環血液中の血小板数を減少させない、血小板の一過性接着反応を引き起こさない、白血球接着活性化作用を有しない等、ある作用や機能を有しないという評価は、 χ^2 二乗検定やt検定などの統計処理により、コントロールと有意差を生じないということにより判断される。

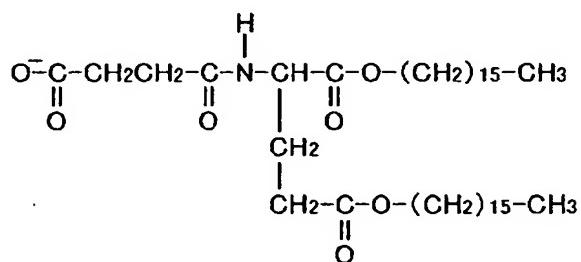
【0013】

また、リポソーム安定化剤に含まれるカルボン酸型脂質がDPEAであることを特徴としてもよい。DPEAの化学式を以下に示す。

20

【0014】

【化5】



30

DPEA

【0015】

さらに、本発明のリポソームは、上記いずれかのリポソーム安定化剤を含有する。

また、本発明のリポソームは、疾患治療用化合物を含んでもよい。

さらに、本発明のキットは、上記いずれかのリポソーム安定化剤を含む。

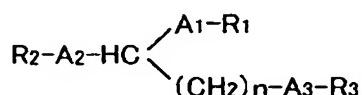
40

【0016】

【発明の実施の形態】

本願発明は、次の一般式

【化6】

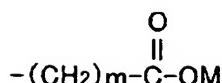


(式中、

R_1 、 R_2 、及び R_3 のうち、いずれか一つが次の一般式

50

【化7】



[式中、Mは水素原子または一価の陽イオンであり、

mはメチレン鎖長を示す1～5の整数である。]

であり、他の二つが、鎖状炭化水素基であり、

A1, A2, 及びA3は、独立にC(O)O, CONH, またはNHC(O)から選択され、nはメチレン鎖長を示す1～3の整数である。)

で表されるカルボン酸型脂質を含むリポソーム安定化剤を提供する。ここで、R1, R2, R3の結合部位は、リジン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、チロシン等の三官能性アミノ酸であることが好ましい。

【0017】

特に、一つの反応性官能基と二つの等しい反応性官能基を有する三官能性アミノ酸、即ち、一つの末端アミノ基と二つの末端カルボキシル基を有するアスパラギン酸やグルタミン酸など、あるいは一つの末端カルボキシル基と二つの末端アミノ基を有するリジン、アスパラギン、グルタミンなどが好ましい。特にアスパラギン酸やグルタミン酸が好ましく、また、ホモシステインやグルタチオンなどでもよい。以下の実施例では、R1, R2, R3の結合部位がグルタミン酸である化合物を用いた。

【0018】

上記カルボン酸脂質を含有したリポソームの調製は定法に従う。例えば、上記カルボン酸脂質をリポソーム安定化剤として、コレステロールと混合し、その混合懸濁水溶液を、超音波処理したり、激しく振とうしたり、搅拌したりすることにより、脂質二重膜でできた直径0.1～1μmのリポソームを含んだリポソーム溶液を調製する。この時、表面修飾剤として、PEG(ポリエチレングリコール)修飾コレステロールなどを含有させることにより、リポソームの表面をPEGで修飾しても良い。そうすることで、リポソームの血中滞留特性を上げることができる。

【0019】

疾患治療用化合物等をリポソームに含ませる場合、あらかじめ、リポソーム溶液作製時に化合物を添加しておくと、その化合物はリポソームに取り込まれる。疾患治療用化合物としては、例えば、核酸、アミノ酸、タンパク質、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗感染剤、生物学的、免疫学的、または血液学的薬剤、皮膚用薬剤、感覚器用薬剤、内分泌系用薬剤、消化器用薬剤、循環器用薬剤、排出器用薬剤、生殖器用薬剤、呼吸器用薬剤、神経系用薬剤、診断用補助剤、栄養剤などが挙げられる。具体的には、遺伝子治療用のDNAやRNA、人工赤血球用のヘモグロビン、癌に対する化学療法剤等の様々な医薬品等がある。

【0020】

こうして調製したリポソームをヒト、マウス、ラットなどのは乳類を含む脊椎動物に投与する。投与方法は、目的によって、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、経鼻投与、経肺投与、経口投与、塗布など、様々な形態が可能である。また、投与方法によって、薬理学的に許容された賦形剤又は基剤を含んだ形でリポソームを投与しても良い。以下の実施例では、ラットに対して静脈内投与を行った。

【0021】

次に、リポソームを投与された動物において、投与したリポソームによる微小循環障害作用を調べる。リン脂質を含んだリポソームが投与されると、それをトリガーにして血小板が活性化する。血小板活性化の際、まず、血小板膜糖タンパク質Ib(GPIb)と粘着性タンパク質であるvWF(von Willebrand factor, フォン・ヴィーレント因子)との結合により発生した細胞内シグナルが、血小板膜糖タンパク質GPIIb/IIIaを活性化し、さらに活性化GPIIb/IIIaに粘着性タンパク質が結合することにより血小板同士が結合し、血小板粘着・凝集が起こる。ま

10

20

30

40

50

た、活性化血小板細胞膜上でのP-セレクチンの発現が誘導され、白血球膜上の糖鎖であるsLex糖鎖と接着し、血管内皮細胞膜上に発現しているP-セレクチンと共に、白血球のローリングに関与する。

【0022】

この過程において、微小循環障害作用として、一過性血小板接着反応及び白血球接着反応が観察される。一過性血小板接着反応の指標としては、例えば、蛍光物質で染色した血小板の観察や、循環血液中の血小板数の測定などを用いることができる。本実施例では、血小板の染色に、カルボキシフルオレセインジアセテート・スクシニミディル・エステル(CFSE、モレキュラー・プロープ社製)を用いた。この物質は、血小板内で、エステラーゼによって蛍光色素に変換され、血小板が蛍光染色される。一方、白血球接着反応の指標としては、例えば、血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着エネルギーの測定や、微小血管壁に接着した白血球数の測定などを用いることができる。本実施例では、白血球接着反応の指標として、微小血管壁に接着した白血球数を測定した。

【0023】

以下の実施例に示すように、カルボン酸型脂質の一つであるDPEAを含むリポソームをラットに投与した時、これらの微小循環障害作用は観察されず、DPEAが微小循環障害作用を持たないリポソーム安定化剤であることがわかる。

このリポソーム安定化剤を、例えばコレステロールなどの必要な試薬とともにキット化することにより、実験者または治療者は簡便に本発明を利用できるようになる。

【0024】

【実施例】

以下に、本発明の一実施例について、詳細に述べる。

<リポソームの作製>

安定化剤としてDPPGを含むリポソームを定法(J. Biochem. vol. 131, p. 611-617, 2002; Bioconjugate Chem. vol. 8, p23-30, 1997を参照のこと)に従って、表1の条件で作製した。本実施例では、さらに、DPPGの代わりに同じmol%のPAまたはDPEAを添加して、リポソームを作製した。

【0025】

【表1】

	PC/CH/DPPG	PC/CH/PA	PC/CH/DPEA
比率	5:5:1	5:5:1	5:5:1
脂質重量%	5	5	5
例数(匹)	6	3	7
pH	7.4	7.4	7.4
PEG	0.3 mol%	0.3 mol%	0.3 mol%

略号: PC、フォスファチジルコリン; CH、コレステロール

【0026】

DPPG及びPAの化学式を以下に示す。

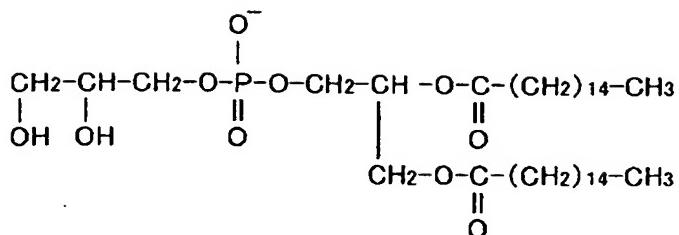
【化8】

10

20

30

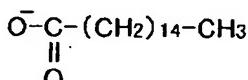
40



DPPG

10

【化 9】



PA

[0 0 2 7]

＜ラット血小板の in vivo 標識化＞

ウイスター系雄ラット（体重280～300g）を、体重1kg当たり50mgのペントバルビタールナトリウム（商品名：ネンブタール）を大腿筋に筋肉注射することにより麻酔した。大腿静脈を剖出し切開して3Frのアトムチューブを挿入した後、皮膚の切開部を縫合した。このアトムチューブに200μlの15mM・CFSEを注入し、血小板を生体蛍光標識した。次に、腹部正中切開により、腸及び腸間膜を腹腔外に露出させた。腸間膜は、95%N₂-5%C_O₂の混合ガスで飽和した37℃のKrebs-Henseleit緩衝液(pH7.4)で表面灌流を行った。

[0 0 2 8]

＜リポソームの投与及び観察＞

腸間膜を正立型生体ビデオ顕微鏡のステージにセットし、10分間放置して、試料を安定させたのち、DPEAを含むリポソーム溶液2mIを0.4mI/分の速度で5分間、上方から投与した。コントロールとして、リポソームの含まれない溶媒のみ、パルミチン酸(PA)を含むリポソーム溶液、DPPGを含むリポソーム溶液を用い、同様な実験を行った。

〔00391〕

透過光及び蛍光（波長 488 nm）で、投与開始から 5 分、10 分、20 分、40 分に、腸間膜の微小循環（細静脈）のビデオ観察を行った。40 倍の対物レンズを用いると、CFSE で標識された血小板は針先大の蛍光シグナルを発し、CFSE で標識された白血球は、蛍光を発するより大きな球形細胞として識別される。

〔00301〕

＜二過性血小板接着活性の評価＞

血小板が活性化されると、一過的に血小板同士の接着が観察される。上記実験条件において、一過性血小板接着活性を定量化するため、リボソーム溶液の投与開始直前と、投与開始後、5分、10分、20分、40分に、接着している細胞数を数え、投与開始直前の接着細胞数を1とし、各時刻における接着細胞数を相対比で表し、グラフ化した。図1に結果を示す。

木と水す。
〔00311〕

DPPGを含むリポソーム溶液を投与した場合、一過的血小板接着が起き、リポソーム投与後20分でその活性は最大（投与前の約2倍）になる。しかし、溶媒のみ、パルミチン酸（PA）を含むリポソーム溶液、またはDPEAを含むリポソーム溶液を投与した時は、一過的血小板接着は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0032】

<白血球接着活性の評価>

血小板の活性化に依存して、白血球が血管壁の血管内皮細胞に接着する。上記実験条件において、白血球接着活性を評価するため、リポソーム溶液の投与開始直前と、投与開始後、5分、10分、20分、40分に、血管壁に接着している細胞数を数え、投与開始直前の接着細胞数を1とし、各時刻における接着細胞数を相対比で表し、グラフ化した。図2に結果を示す。

【0033】

PAを含むリポソーム溶液を投与した場合、白血球の血管壁接着が起き、リポソーム投与後5分でその活性は最大（投与前の約5倍）になり、40分後もその活性は変わらない。
しかし、溶媒のみ、DPPGを含むリポソーム溶液、またはDPEAを含むリポソーム溶液を投与した時には、白血球の接着活性は観察されなかった。

10

【0034】

<血中血小板濃度の測定>

以上の実験終了後、1mlの採血を大静脈より行い、各実験条件における単位体積当たりの血小板数（血小板濃度）の測定を行った。図3に結果を示す。

溶媒のみを投与した時に比べ、DPPGまたはPAを含むリポソーム溶液を投与した場合、血中の血小板濃度は減少するが、DPEAを含むリポソーム溶液を投与した場合には、血小板濃度は変わらなかった。

20

【0035】

【発明の効果】

本発明によって、血小板活性化作用や白血球接着活性化作用などの微小循環障害作用の生じないリポソーム安定化剤、そのリポソーム安定化剤を含有したリポソーム、及びそのリポソーム安定化剤を含んだキットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施例において、一過性血小板接着活性の測定結果を示すグラフである。データを示す点から垂直に引かれている線分は標準偏差を表す。*は、統計的に有意に差があるデータであることを示す。

30

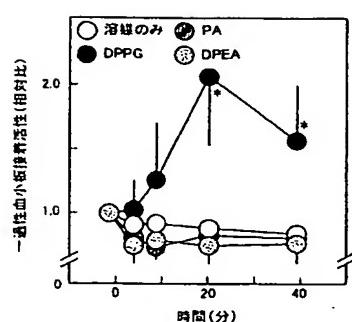
【図2】

本発明の一実施例において、白血球接着活性の測定結果を示すグラフである。データを示す点から垂直に引かれている線分は標準偏差を表す。*は、統計的に有意に差があるデータであることを示す。

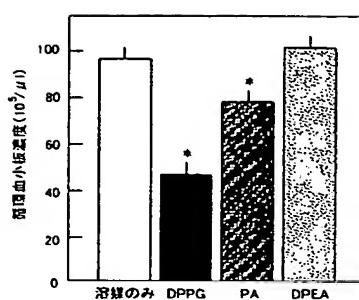
【図3】

本発明の一実施例において、白血球接着活性の測定結果を示すグラフである。データを示す点から垂直に引かれている線分は標準偏差を表す。*は、統計的に有意に差があるデータであることを示す。

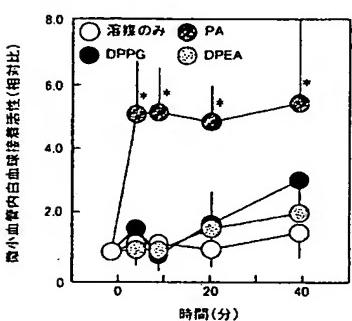
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72) 発明者 菅沼 和弘

東京都新宿区信濃町35番 慶應義塾大学医学部内

F ターム(参考) 4C076 AA19 DD15H DD52L DD52Q DD63H DD70L FF36 FF67



【要約の続き】

mはメチレン鎖長を示す1～5の整数である。]

であり、他の二つが、鎖状炭化水素基であり、

A1, A2, 及びA3は、独立にC(O)O, CONH, またはNHC(O)から選択され、

nはメチレン鎖長を示す1～3の整数である。)

で表されるカルボン酸型脂質を含むリポソーム安定化剤、そのリポソーム安定化剤を含有したリポソーム、及びそのリポソーム安定化剤を含んだキットとする。

【選択図】 図1